

10/525 449

DT15 R PCT/PTO 24 FEB 2005

Docket No.: 1169-034

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of :
Isabelle POQUET et al. : *Confirmation No. Unassigned as yet*
U.S. Patent Application No.: *Unassigned as yet* : *Group Art Unit: Unassigned as yet*
Filed: *herewith* : *Examiner: Unassigned as yet*

For: ZINC-REGULATED PROKARYOTIC EXPRESSION CASSETTES

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicant hereby claims the priority of *France Patent Application No. PCT/FR2003/002606 filed August 29, 20003*, and under 35 U.S.C. 119, Applicants hereby claim the priority of *France Patent Application No. 02 10805 filed August 30, 2002*.

Respectfully submitted,

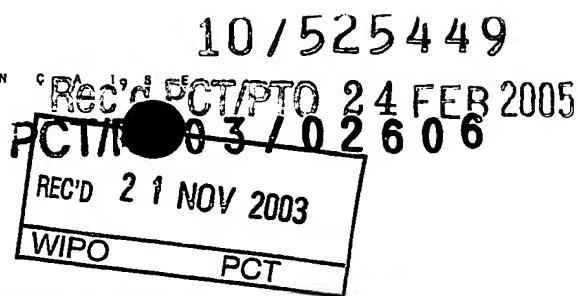
LOWE HAUPTMAN & BERNER, LLP



William E. Beaumont
Registration No. 30,996

1700 Diagonal Road, Suite 310
Alexandria, Virginia 22314
(703) 684-1111 WEB/sj
Facsimile: (703) 518-5499
Date: February 24, 2005

BEST AVAILABLE COPY



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 02 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

<p>REMISE DES PIÈCES DATE 30 AOÛT 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0210805 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 30 AOÛT 2002</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS</p>	
<p>Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPbv539/116FR</p>			
<p>Confirmation d'un dépôt par télécopie</p>		<p><input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie</p>	
<p>2 NATURE DE LA DEMANDE</p> <p>Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____ <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date _____ Transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____</p>		<p>Cochez l'une des 4 cases suivantes</p>	
<p>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</p> <p>CASSETTES D'EXPRESSION PROCARYOTES REGULEES PAR LE ZINC.</p>			
<p>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</p>		<p>Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>	
<p>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</p> <p>Nom ou dénomination sociale _____ Prénoms _____ Forme juridique _____ N° SIREN _____ Code APE-NAF _____ Domicile ou siège Rue _____ Code postal et ville _____ Pays _____ Nationalité _____ N° de téléphone (facultatif) _____ Adresse électronique (facultatif) _____</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique</p> <p>INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) Etablissement public 147, rue de l'Université 75007 PARIS FRANCE Française N° de télécopie (facultatif) _____</p>	
<p><input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 30 AOÛT 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0210805 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	OB 540 & W / 010801
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		MJPbv539/116FR	
6 MANDATAIRE <i>(s'il y a lieu)</i> Nom Prénom Cabinet ou Société		VIALLE-PRESLES Marie José CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	6, avenue de Messine	
	Code postal et ville	75 008 PARIS	
	Pays	01.45.62.75.00	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.45.62.04.86	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		ores@cabinet-ores.com	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
7 INVENTEUR(S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 30 août 2002 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

L'invention concerne la production de protéines hétérologues chez des bactéries à Gram-positif, notamment des bactéries lactiques.

A coté de leurs usages traditionnels dans l'industrie agro-alimentaire, les bactéries lactiques sont actuellement de plus en plus utilisées en tant que cellules hôtes pour la production de protéines hétérologues d'intérêt. Ces protéines d'intérêt peuvent être de nature très variée, et il est donc souhaitable de disposer du choix le plus large possible d'outils d'expression pour pouvoir optimiser leur production en fonction des spécificités de chacune d'entre elles.

De manière générale, il est nécessaire d'utiliser des promoteurs forts, permettant d'obtenir un niveau d'expression suffisant du gène d'intérêt. Dans certains cas, on peut utiliser des promoteurs constitutifs ; dans d'autres cas (par exemple lorsque le produit du gène d'intérêt est toxique pour la bactérie hôte ou risque d'interférer avec le métabolisme de celle-ci), il est préférable d'utiliser des promoteurs inductibles, permettant de déclencher ou d'arrêter l'expression au moment souhaité.

Bien que les bactéries lactiques possèdent de nombreux gènes dont la transcription est régulée par divers facteurs, on ne dispose à l'heure actuelle que d'un choix relativement restreint de promoteurs inductibles utilisables en pratique pour la construction de cassettes d'expression de gènes d'intérêt (pour revue, cf. DE VOS, Curr. Op. Microbiol., 2, 289-295, 1999). En effet, cette utilisation demande non seulement que les promoteurs concernés soient régulables, mais encore qu'il existe un différentiel d'expression suffisant entre les différents états d'induction ; idéalement, l'expression doit atteindre un niveau élevé en conditions d'induction, et pouvoir être totalement bloquée en conditions de non-induction. En outre, il est nécessaire de pouvoir

maîtriser facilement les facteurs intervenant dans la régulation de ces promoteurs.

Lors de travaux précédents, visant à identifier des protéines exportées de *L. lactis* (POQUET et al., J. Bacteriol., 180, 1904-1912, 1998), les Inventeurs ont cloné, en fusion avec le gène rapporteur $\Delta_{SE}Nuc$, un fragment d'ADN génomique de la souche *L. lactis* MG1363, comprenant un gène dénommé à l'époque *nlp3* (new lipoprotein 3), dont le produit présente des homologies avec une protéine de *S. pneumoniae* impliquée dans le transport des métaux. La séquence de ce fragment est disponible sur GENBANK sous le numéro U95834.

Les Inventeurs ont également observé que le gène *nlp3* était négativement régulé par des cations métalliques divalents, notamment Zn^{2+} (POQUET et al. « Use of a new reporter tool to demonstrate metal regulation of *nlp3*, a gene putatively involved in metal uptake in *Lactococcus lactis* » ; 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Veldhoven, Pays-Bas, 19-23 septembre 1999).

D'autre part, dans le cadre du séquençage complet du génome de *L. lactis* IL1403, le gène *nlp3*, renommé *zitS*, a été identifié en tant que constituant d'un opéron, dénommé *zitRSQP* (BOLOTIN et al., Antonie van Leeuwenhoek, 76, 27-76, 1999 ; BOLOTIN et al., Genome Res. 11, 731, 2001). Par homologie avec des séquences connues, des fonctions putatives dans le transport du zinc ont été attribuées aux gènes de cet opéron. Ainsi, le produit du gène *zitP* constituerait la perméase du système de transport, les produits du gène *zitS* et du gène *zitQ* assureraient respectivement la liaison avec le substrat et la liaison avec l'ATP, et le produit du gène *zitR*, qui présente des homologies avec la famille de répresseurs transcriptionnels *marR*, serait impliqué dans la régulation du transport du zinc.

Il n'avait jusqu'à présent pas été envisagé d'utiliser le système de régulation de l'opéron *zitRSQP*

pour contrôler l'expression de gènes hétérologues. En effet, bien qu'une régulation négative puisse être déclenchée par l'ajout de zinc (POQUET et al., 1999 précité), le niveau d'expression de base observé en l'absence de cette régulation négative n'apparaissait pas suffisant pour permettre une production satisfaisante de protéines d'intérêt. En outre, on ignorait si le répresseur putatif ZitR était effectivement impliqué dans la répression de l'expression de cet opéron, et si d'autres régulateurs, notamment les régulateurs pléiotropes *flp*, décrits comme intervenant dans la régulation du transport du zinc chez *L. lactis* (GOSTICK et al., Mol. Microbiol., 31, 1523-35, 1999 ; SCOTT et al., FEMS Microbiol. Lett., 192, 85-89, 2000), pouvaient également être impliqués, soit en tant que co-répresseurs, soit au contraire en tant qu'activateurs éventuels.

Or, en poursuivant leurs études sur la régulation de l'opéron *zitRSQP*, les Inventeurs ont constaté, en présence de très faibles concentrations en Zn^{2+} , un niveau maximal d'expression beaucoup plus fort que ce que l'on pouvait supposer d'après les expérimentations antérieures, et qui permet d'atteindre un facteur d'induction supérieur à 100. En outre, ils ont constaté que l'expression était indépendante des régulateurs *flp*, et pouvait être totalement contrôlée par l'intermédiaire de la protéine ZitR.

L'étude de la structure du promoteur de l'opéron *zitRSQP* de *L. lactis* a permis aux Inventeurs de mettre en évidence, outre les éléments classiquement présents dans les promoteurs bactériens, à savoir les boîtes -35 (TTGACA) et -10 (TATAAT) séparées par 17pb, une séquence en palindrome chevauchant la boîte -35, qui représente très probablement le site de fixation de ZitR.

Les observations rapportées ci-dessus permettent de supposer que la régulation de *zitRSQP*

s'effectue selon le mécanisme suivant : le répresseur ZitR peut former avec le Zn^{2+} intracellulaire un complexe présentant une affinité très importante pour le site de fixation chevauchant la boîte -35 ; le complexe ZitR- Zn^{2+} fixé sur le palindrome empêche l'accès de l'ARN polymérase à la boîte -35, et réprime donc la transcription ; en revanche, la forme non-complexée de ZitR ne se fixe pas sur le site -35, permettant la transcription de l'opéron, qui s'effectue alors avec une grande efficacité.

La régulation de l'opéron *zitRSQP* par l'intermédiaire de ZitR dépend donc de la concentration intracellulaire en Zn^{2+} , elle-même fonction de la disponibilité en Zn^{2+} dans le milieu de culture.

L'opéron *zitRSQP* représente très probablement un système de transport du zinc de très haute affinité qui n'est utilisé par la bactérie que dans des conditions de carence en zinc très sévère, pour permettre la survie cellulaire ; en revanche, dans les conditions de culture habituelles sur milieux riches, le zinc est présent en abondance dans l'environnement, et transporté dans la cellule par des systèmes de moindre affinité que le complexe ZitSPQ, dont la synthèse est alors réprimée.

Ces propriétés du système de régulation de l'opéron *zitRSQP* de *L. lactis* mises en évidence par les Inventeurs permettent de proposer son utilisation pour la production de protéines d'intérêt dans des bactéries-hôtes, notamment des bactéries Gram-positif, et en particulier des bactéries lactiques.

La présente invention a pour objet les différents aspects de cette utilisation.

Selon une première variante, la présente invention a pour objet une cassette d'expression constituée par :

- un promoteur bactérien, dénommé ci-après p_{zn} , contenant un site de fixation pour la protéine ZitR

de *Lactococcus lactis*, lequel site comprend la séquence suivante :

AAAAATAANGTNNNNNNNTTGACATTATTTTT

(SEQ ID NO:1),

5 dans laquelle TTGACA représente la boîte -35 dudit promoteur, et N représente A, C, G, ou T ;

- une séquence codant pour un polypeptide présentant au moins 80%, de préférence au moins 85%, et de manière tout à fait préférée au moins 95% d'identité
10 avec la protéine ZitR de *Lactococcus lactis* (GENBANK AAK06214), placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur ;

- au moins un site de restriction permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous
15 contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, le promoteur p_{zn} comprend la séquence suivante :

AAAAATAANGTNNNNNNNTTGACATTATTTTTNNNNNNNNNTATAAT

20 (SEQ ID NO:2)

dans laquelle TATAAT représente la boîte -10 dudit promoteur.

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit promoteur p_{zn} contient un
25 site de fixation pour la protéine ZitR de *Lactococcus lactis* comprenant la séquence suivante :

AAAAATAAYGTTAAGTGGTTGACATTATTTTT

(SEQ ID NO:3),

dans laquelle Y représente T ou C.

30 A titre d'exemple de promoteurs p_{zn} utilisables pour la construction d'une cassette d'expression conforme à l'invention, on citera :

- le promoteur p_{zn} de la souche MG1363 de *Lactococcus lactis*, qui comprend la séquence :

35 AAAAATAATGTTAAGTGGTTGACATTATTTTTACTTTGCTATATAATTAACCAGTA

(SEQ ID NO:4) ;

- le promoteur p_{zn} de la souche IL1403 de *Lactococcus lactis*, qui comprend la séquence :

AAAAAATAACGTTAACTGGTTGACATTATTTTTCTTTGCTATATAATTAACCGTA
(SEQ ID NO:5)

5 Selon une seconde variante, la présente invention a pour objet une cassette d'expression constituée par :

 - un promoteur bactérien p_{zn} , tel que défini ci-dessus ;

10 - au moins un site de restriction permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

 La présente invention a également pour objet des cassettes d'expression résultant de l'insertion d'une
15 séquence nucléotidique d'intérêt dans une cassette d'expression conforme à la première ou à la seconde variante de l'invention, sous contrôle transcriptionnel du promoteur p_{zn} .

 Ladite séquence nucléotidique d'intérêt peut
20 être toute séquence que l'on souhaite exprimer sous contrôle transcriptionnel du promoteur p_{zn} . Il peut s'agir notamment de toute séquence codant pour une protéine hétérologue d'intérêt que l'on désire produire dans une bactérie-hôte ; ladite protéine peut le cas échéant être
25 une protéine de fusion, associant des séquences polypeptidiques d'origine diverse.

 Sont exclues toutefois les cassettes d'expression conformes à la première variante de l'invention et comprenant tout ou partie de la séquence
30 codant pour la protéine ZitS de *L. lactis*, fusionnée à un gène rapporteur.

 Des cassettes d'expression conformes à l'invention peuvent, le cas échéant, comprendre en outre
----- les éléments nécessaires pour permettre l'adressage de la -----
35 protéine d'intérêt à la surface cellulaire, ou sa sécrétion dans le milieu de culture.

Dans ce cadre, la présente invention a pour objet des cassettes d'expression résultant de l'insertion d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide d'adressage extracellulaire, et d'au moins un site de restriction permettant le clonage d'une séquence nucléotidique d'intérêt en fusion traductionnelle avec ledit peptide d'adressage, sous contrôle transcriptionnel du promoteur p_{zn} , dans une cassette d'expression conforme à l'invention.

Ledit peptide d'adressage peut être par exemple un peptide signal de sécrétion, un domaine transmembranaire, un signal d'ancrage à la paroi, etc.

De nombreux peptides d'adressage utilisables dans le cadre de la présente invention sont connus en eux mêmes. A titre d'exemples non limitatifs, on citera les peptides décrits dans la publication de POQUET et al. (1998, précité), ou dans la publication de LE LOIR et al. (Appl. Environ. Microbiol., 67, 4119-4127, 2001).

Pour la production de protéines sécrétées, un peptide d'adressage extracellulaire préféré est le peptide signal de la protéine Exp4 de *L. lactis*, qui répond à la séquence :

MKKINLALLTLATLMGVSSSTAVVFA (SEQ ID NO: 6).

La présente invention a également pour objet tout vecteur recombinant comprenant un insert constitué par une cassette d'expression conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet des bactéries à gram-positif transformées par au moins une cassette d'expression conforme à l'invention.

De préférence, il s'agit de bactéries lactiques, notamment des lactocoques, des lactobacilles ou des streptocoques thermophiles.

Le cas échéant, il peut s'agir de bactéries provenant de souches bactériennes comportant une ou plusieurs modifications de leur génome, visant à améliorer la production et/ou la sécrétion de protéines

exprimées dans lesdites bactéries, et/ou à éviter leur dégradation. Par exemple, dans le cadre de la production de protéines exportées, on peut utiliser une souche bactérienne dans laquelle l'activité protéasique PrtP
5 et/ou l'activité protéasique HtrA sont inactives, telle que celle décrite dans la Demande PCT WO 00/39309 ou une souche bactérienne surproduisant une protéine permettant de stabiliser les protéines exportées, telle que la protéine Nlp4 de *Lactococcus lactis*, ou un de ses
10 homologues (POQUET et al. 1998, publication précitée).

La présente invention a également pour objet l'utilisation de cassettes d'expression ou de vecteurs recombinants conformes à l'invention pour la production de protéines d'intérêt dans une bactérie à gram-positif,
15 notamment des bactéries lactiques.

Les cassettes d'expression conformes à la première variante de l'invention peuvent être utilisées dans une bactérie-hôte, pour contrôler le moment de l'expression d'un gène d'intérêt inséré dans le site de
20 clonage, et le niveau de cette expression.

Lorsque l'on cultive la bactérie-hôte en présence d'une quantité de zinc en excès par rapport à ses besoins, l'expression du gène d'intérêt est totalement réprimée. La déplétion en Zn^{2+} du milieu de
25 culture (qui peut s'effectuer simplement par addition d'un agent chélateur des cations divalents, tel que l'EDTA) permet de lever la répression, et de provoquer l'expression du gène. Le niveau d'expression peut être facilement régulé par la quantité d'agent chélateur
30 ajouté.

On peut aussi mettre en culture la bactérie-hôte dans un milieu comprenant une quantité de zinc juste suffisante pour couvrir ses besoins pendant une période donnée de la culture (par exemple pendant la phase de
35 croissance). Dans ce cas, l'épuisement du zinc à l'issue de cette période provoque l'expression du gène d'intérêt.

Dans ce cadre, la présente invention a pour objet un procédé de production d'une protéine d'intérêt dans une bactérie à gram-positif, et notamment une bactérie lactique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - l'introduction dans ladite bactérie d'une cassette d'expression conforme à la première variante de l'invention, comprenant une séquence codant pour ladite protéine d'intérêt ;
- la culture de ladite bactérie dans un milieu
- 10 contenant une quantité de Zn^{2+} suffisante pour réprimer l'expression de ladite protéine ;
- l'induction de la production de ladite protéine par déplétion en Zn^{2+} dudit milieu ;
- la récupération de la protéine produite.

15 Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé conforme à l'invention, la déplétion en Zn^{2+} dudit milieu est obtenue par addition d'un chélateur des cations divalents.

 Selon un autre mode de mise en œuvre préféré

20 de la présente invention, la déplétion en Zn^{2+} dudit milieu est obtenue par culture de la bactérie jusqu'à épuisement du Zn^{2+} initialement présent dans le milieu.

 D'après les expérimentations effectuées par les Inventeurs sur la souche modèle MG1363 de *L. lactis*,

25 le maintien pendant toute la durée de la culture d'une quantité de Zn^{2+} suffisante pour réprimer l'expression sous contrôle du système $p_{zn}/ZitR$ peut être assuré par l'utilisation d'un milieu contenant en début de culture, de l'ordre de 1 à 2 μM de Zn^{2+} , le seuil de répression

30 totale pouvant être estimé à entre 100nM et 1 μM de Zn^{2+} . La concentration en Zn^{2+} du milieu en dessous de laquelle on obtient la levée complète de la répression de p_{zn} est très faible (de l'ordre du nanomolaire, et au maximum de quelques nanomolaires). La quantité de chélateur des

35 cations divalents nécessaire pour effectuer la déplétion en Zn^{2+} et induire l'expression sous contrôle du promoteur

p_{zn} varie selon la quantité de Zn^{2+} apportée initialement au milieu de culture ; à titre indicatif, dans le cas de la souche MG1363, pour un milieu de culture riche tel que le milieu M17, une déplétion en Zn^{2+} permettant d'induire
 5 une expression maximale peut être obtenue à partir d'une concentration d'EDTA de l'ordre de 0,1 mM ; en milieu SA, qui contient 10nM de Zn^{2+} une déplétion en Zn^{2+} permettant d'induire une expression maximale peut être obtenue à partir d'une concentration d'EDTA de l'ordre
 10 de 0,01 mM.

Les quantités de Zn^{2+} et d'agent chélateur de cations mentionnées ci-dessus sont données à titre indicatif. A partir de ces indications, et des autres informations fournies par le descriptif de la présente
 15 invention, l'homme du métier peut facilement déterminer, par des tests préalables, effectués par exemple en plaçant un gène rapporteur sous contrôle du système p_{zn} /ZitR dans une cassette d'expression conforme à l'invention, les quantités les plus appropriées selon
 20 l'espèce ou la souche bactérienne concernée, les conditions opératoires mises en œuvre, telles que le milieu utilisé, les modalités de l'ajout de Zn^{2+} et/ou d'agent chélateur (par exemple, en une seule fois, en plusieurs fois, en continu, etc.), et le niveau
 25 d'expression souhaité.

Des cassettes d'expression conformes à la seconde variante de l'invention seront utilisées de préférence dans des souches de bactéries, notamment de lactocoques, dans lesquelles le répresseur ZitR endogène
 30 est inactif, ainsi qu'éventuellement le complexe ZitSPQ. Dans ces conditions, le promoteur p_{zn} constitue un promoteur fort, permettant l'expression de la protéine d'intérêt pendant toute la durée de la culture.

L'inactivation du récepteur ZitR et du complexe ZitSPQ

35 peut s'effectuer de manière connue en elle-même, notamment par mutagenèse dirigée de l'opéron zitRSQP.

Dans ce cadre, la présente invention a pour objet un procédé de production d'une protéine d'intérêt dans une bactérie à gram-positif dans laquelle le répresseur ZitR endogène est inactif, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'introduction dans ladite bactérie d'une cassette d'expression conforme à la seconde variante de l'invention, comprenant une séquence codant pour ladite protéine d'intérêt ;
- la culture de ladite bactérie ;
- la récupération de la protéine produite.

La présente invention peut être mise en œuvre par exemple :

- dans le domaine de la production de protéines hétérologues d'intérêt thérapeutique par génie génétique, pour mieux contrôler la production de ces protéines par les cultures de bactéries transformées ;
- en industrie agro-alimentaire, notamment dans la fabrication de produits fermentés, pour contrôler selon le stade de la fermentation, la production de protéines d'intérêt permettant notamment d'influer sur la qualité du produit fermenté fini.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs, illustrant la construction de cassettes d'expression conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : REGULATION DE ZIT PAR Zn^{2+} CHEZ *L. LACTIS*

L'expression de zit en fonction de la concentration en Zn^{2+} du milieu est mesurée par 2 techniques différentes:

*La mesure de l'activité Nuc de la fusion ZitRS- Δ_{SP} Nuc, portée par le plasmide pVE8020, dans la souche de *L. lactis* MG1363. Le plasmide pVE8020 résulte du clonage du fragment d'ADN chromosomique de la souche MG1363 correspondant à $p_{zn}zitRzitS'$ (GenBank U95834) dans

le plasmide pFUN (POQUET et al., 1998, précité ; GenBank AF038666).

*La quantification de l'ARNm de *zitS* dans la souche MG1363 sauvage (expression endogène de *zitS*) et dans la souche MG1363 transformée par pVE8020).

Effet du zinc sur l'activité Nuc sous contrôle du promoteur p_{zn}

La mesure de l'activité Nuc (nucléase de *Staphylococcus aureus*) est effectuée sur des boîtes de culture contenant du milieu chimiquement défini SA (JENSEN et HAMMER, *Appl. Env. Microbiol.* 59, 4363-66, 1993), qui comprend une quantité minimale de chacun des éléments nécessaires à la croissance bactérienne, et est notamment pauvre en zinc (10 nM de $ZnSO_4$).

On effectue sur ce milieu un dépôt d'une solution de Zn^{2+} (20 μ l de $ZnSO_4$ à 0,1M) sous forme d'une strie traversant la boîte.

Après absorption du dépôt de Zn^{2+} , on effectue 2 dépôts de bactéries sous forme de 2 stries parallèles entre elles, et coupant perpendiculairement la strie de zinc : un dépôt témoin, (souche MG1363 transformée par un plasmide (pVE8009) portant la fusion $Usp-\Delta_{sp}Nuc$ sous contrôle du promoteur Usp) et un dépôt de la souche MG1363 transformée par pVE8020 (MG1363(pVE8020)).

L'incubation pendant une nuit à 30°C des boîtes permet la croissance des bactéries et la création d'un gradient de concentrations en Zn^{2+} décroissantes par diffusion à partir de la strie de $ZnSO_4$.

On réalise un test coloré de l'activité nucléasique, en déposant sur les boîtes une surcouche de détection contenant du bleu de toluidine et en incubant à 37°C (LACHICA et al., *Appl. Microbiol.*, 21, 585-87, 1971; LE LOIR et al., *J. Bacteriol.*, 176, 5135-39, 1994) :

~~l'activité-Nuc-est-détectée-par-le-virage-au-rose-de-la~~
surcouche de détection, formant un halo autour des stries de dépôts bactériens.

Alors que le halo observé autour de la strie correspondant au dépôt témoin est de taille et d'intensité constante sur toute la longueur de la strie bactérienne (ce qui indique que ni l'activité nucléasique d'Usp- $\Delta_{sp}Nuc$, ni son exportation, ni son expression ne dépendent du Zn^{2+}), celui observé autour de la strie correspondant au dépôt MG1363(pVE8020) est limité à l'extrémité la plus éloignée du dépôt de zinc, où sa largeur et son intensité sont comparables à celles observées pour le dépôt témoin ; l'intensité décroît à l'approche du dépôt de zinc, et on n'observe aucun halo au voisinage de l'intersection avec celui-ci.

Il apparaît donc que des concentrations élevées de zinc répriment l'expression du promoteur de l'opéron *zitRSQP*.

Effet de l'EDTA sur l'activité Nuc sous contrôle du promoteur p_{Zn}

La mesure de l'activité Nuc est effectuée sur des boîtes de culture contenant du milieu M17 (TERZAGHI and SANDINE, *Appl. Environ. Microbiol.*, 29, 807-13, 1975) riche en zinc.

On effectue un dépôt d'une solution d'EDTA (20 μ l à 0,1M), ainsi qu'un dépôt de la souche MG1363 contenant le plasmide témoin, et un dépôt de la souche MG1363(pVE8020) sous forme de stries, comme décrit ci-dessus.

Après incubation à 30°C pendant une nuit, l'activité Nuc est détectée comme décrit ci-dessus.

Le halo observé autour de la strie correspondant au dépôt témoin est, comme celui observé dans le cas du zinc, de taille et d'intensité constante sur toute la longueur de la strie. En revanche, de façon surprenante, celui observé autour de la strie correspondant au dépôt MG1363(pVE8020) est, au voisinage du dépôt d'EDTA, beaucoup plus intense que celui du dépôt

témoin ; l'intensité décroît très rapidement lorsque l'on s'éloigne de cette intersection.

Il apparaît donc que l'EDTA induit l'expression du promoteur de l'opéron *zitRSQP*. Le niveau d'expression apparaît en outre plus élevé que celui observé à distance de la strie de zinc dans l'expérimentation précédente, et en outre plus élevé que celui du témoin, contrôlé par le promoteur *Usp* : on peut donc atteindre un très fort niveau d'induction de *p_{zn} zitR* grâce à des concentrations en EDTA qui n'affectent pas la croissance bactérienne (comme 0,1M en M17).

Evaluation quantitative de l'effet de l'EDTA sur l'activité Nuc sous contrôle du promoteur *p_{zn}*

Pour évaluer quantitativement l'effet de l'EDTA sur l'activité Nuc exprimée sous contrôle du promoteur de l'opéron *zitRSQP*, les expérimentations suivantes sont effectuées :

La souche MG1363 transformée par pVE8020 est cultivée en milieu M17 supplémenté en érythromycine à 5 µg/l, jusqu'en phase exponentielle ($DO_{600} = 0,3$) ou stationnaire ($DO_{600} = 1,2$). Cette culture est divisée en 4 sous-cultures ; 3 d'entre elles sont alors additionnées d'EDTA à diverses concentrations finales (3,3 mM ; 0,33 mM ; 0,033 mM) ; la quatrième ne reçoit pas d'addition d'EDTA (0 mM EDTA). Après 30 min ou 1h30 d'incubation, des échantillons de chaque culture sont prélevés. Le nombre de cellules de chaque échantillon est normalisé en adaptant le volume de façon à obtenir un nombre de cellules équivalent à celui de 1 ml de culture à $DO_{600} = 1$.

Les cellules sont ensuite lysées et précipitées par un traitement à l'acide trichloroacétique concentré (16,7%), lavées à l'acétone

~~----- (80%) et reprises dans 100 µl de tampon Tris (50 mM pH7) -----~~

10 µl de chaque échantillon ainsi traité sont déposés sur une boîte contenant du milieu de détection de l'activité

Nuc (LACHICA et al., 1971 ; LE LOIR et al., 1994, précité). L'activité Nuc est évaluée par la taille du halo et l'intensité de la coloration rose autour de chaque dépôt. Pour une évaluation quantitative du niveau d'activité, on dépose sur la même boîte une gamme étalon de protéine Nuc purifiée (dilution de 4 en 4 à partir de 400 ng).

On constate que la taille du halo et l'intensité de la coloration varient en fonction de la concentration en EDTA qui a été utilisée pour traiter les cellules. En l'absence d'EDTA, on observe un halo très fin sans coloration nette ; à 0,033 mM d'EDTA, on observe un fin halo, nettement coloré en rose ; à 0,33 mM, on observe un halo large, de coloration rose très intense. On n'observe aucune augmentation de la taille et de l'intensité du halo de 0,33 à 3,3 mM. Aucune différence significative de la taille et de l'intensité du halo n'est notée entre l'addition d'EDTA effectuée en phase exponentielle et celle effectuée en phase stationnaire, ni entre les deux temps d'incubation (30 mn ou 1h 30).

Ces résultats indiquent que le niveau d'induction de l'expression de p_{zn} augmente avec la concentration en EDTA ajoutée, jusqu'à un seuil de saturation (qui est atteint en milieu M17, dans les conditions expérimentales décrites ici, pour une concentration en EDTA de l'ordre de 0,33 mM, quelle que soit la phase de croissance et le temps d'incubation).

La comparaison avec la gamme étalon de protéine Nuc purifiée permet d'estimer que le niveau d'induction obtenu par addition de 0,33 mM d'EDTA en milieu M17 est de l'ordre de 100.

Effet du zinc sur la transcription de l'opéron *zit*

Les souches utilisées sont la souche sauvage de *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363, et sa dérivée mutante FNR (double mutant *flpA flpB*, SCOTT et al., 2000, précité ; GOSTICK et al., 1999, précité). Les gènes *flp*

sont des régulateurs pléiotropes intervenant notamment dans le transport du zinc : chez FNR, la concentration intracellulaire en zinc est sept à huit fois plus faible que celle de la souche sauvage (GOSTICK et al., 1999, 5 précité).

A partir d'une préculture d'une nuit de chaque souche en milieu SA supplémenté en érythromycine à 5 µg/l, et pour FNR uniquement, en tétracycline à 5 µg/l, on effectue une culture à 30°C en milieu SA (dont la 10 concentration en Zn^{2+} est de 10nM). En phase exponentielle précoce (DO_{600} 0,07 à 0,08), cette culture est divisée en deux parties : l'une (+) est additionnée de $ZnSO_4$ pour obtenir une concentration finale en Zn^{2+} de 2 µM (qui n'affecte pas la croissance) ; l'autre (-) ne reçoit 15 aucune addition. La culture est poursuivie sans modification jusqu'en phase exponentielle (DO_{600} = 0,2) ou stationnaire (DO_{600} = 0,8). L'ARN des bactéries est alors extrait selon le protocole décrit par RAYA et al., (*J. Bacteriol.*, 180, 3174-80, 1998).

20 Après l'extraction, la concentration en ARN est évaluée par mesure de la DO_{260} : 60 µg d'ARN sont déposés sur un gel à 1% d'agarose. Après migration et transfert sur une membrane de nylon, les transcrits *zitRS* sont détectés par transfert de Northern, avec une sonde 25 spécifique du gène *zitS*.

Les résultats sont illustrés par la Figure 1.

Ces résultats montrent que l'on n'observe un ARNm spécifique de la taille attendue pour *zitRS* qu'en l'absence (-) d'addition de Zn^{2+} et jamais en sa présence 30 (+) quelle que soit la souche, et quelle que soit la phase de croissance au moment de l'addition.

Cela montre 1) que la répression par le Zn^{2+} de l'expression de l'opéron *zit* s'effectue au niveau transcriptionnel, 2) qu'elle est totale pour une 35 concentration en Zn^{2+} du milieu de 2µM, et 3) qu'elle est indépendante des gènes *flp*, puisqu'elle s'exerce dans le

mutant FNR. Ce dernier point indique que la régulation par le Zn^{2+} dépend entièrement du régulateur *zitR*.

En absence d'addition de Zn^{2+} , on observe un niveau d'expression très fort, sauf pour la souche MG1363 en phase exponentielle, où l'on observe qu'une faible expression. Ces résultats indiquent que malgré la très faible concentration en Zn^{2+} (10 nM) du milieu SA de départ, la concentration intracellulaire en Zn^{2+} au moment de la phase exponentielle où a été effectué le prélevement est encore suffisante, dans le cas de la souche MG1363, pour réprimer fortement la transcription de l'opéron *zit*. En revanche, en phase stationnaire, après épuisement du Zn^{2+} présent dans le milieu, l'expression est très forte. Dans le cas de la souche FNR, la concentration en Zn^{2+} de 10 nM du milieu de départ est insuffisante pour assurer, même pendant la phase exponentielle, une concentration en Zn^{2+} intracellulaire réprimant la transcription de l'opéron *zit*.

Il apparaît donc que l'induction de l'expression dépend directement de la concentration intracellulaire en Zn^{2+} , et que celle-ci doit être très faible pour obtenir une expression maximale.

Ceci peut être obtenu notamment :

1) En abaissant la concentration extracellulaire en Zn^{2+} ; celle-ci doit en effet être très inférieure à 10nM, où l'on observe encore une répression importante. L'abaissement de la concentration extracellulaire en Zn^{2+} peut par exemple s'effectuer par l'addition d'un agent chélateur comme l'EDTA (quelle que soit la phase de croissance), ou en opérant en phase stationnaire, dans des conditions où le Zn^{2+} initialement présent dans le milieu a été consommé par les bactéries au cours de la croissance, ou par une combinaison de ces deux moyens.

2) En utilisant des mutants dans lesquels le transport du zinc est affecté, et qui possèdent de ce

fait une concentration en Zn^{2+} intra-cellulaire très faible, tels que la souche FNR mentionnée ci-dessus.

EXEMPLE 2 : CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION SOUS CONTROLE DU SYSTEME DE REGULATION DE L'OPERON ZITRSQP

5 Construction de plasmides contenant le système de régulation de l'opéron zitRSQP

Plasmide pDI11

Le système promoteur-régulateur $p_{zn-zitR}$ de la souche MG1363 est obtenu par amplification PCR (kit
10 DyNAzyme EXT de FINNZYMES) d'une partie de l'insert $p_{znzitRzitS'}$ (GenBank U95834) du plasmide pVE8020 avec les oligonucléotides oligo 9 et oligo MUT :

Oligo 9 : 5'-CTAATGAGCGGGCTTTT-3' (SEQ ID NO: 7)

Oligo MUT : 5'-GCTCTAGAGCGGGATCCTTCATCGAACTCTTCAG-3'
15 (SEQ ID NO: 8)

Oligo 9 s'hybride avec le site de clonage multiple (MCS) de pFUN, et permet d'amplifier tout insert cloné dans ce vecteur. Oligo MUT permet d'éliminer le site de fixation potentiel des ribosomes (RBS) de *zitS* et
20 pour faciliter le clonage du fragment PCR : sa séquence, située dans la zone de chevauchement entre *zitR* et *zitS*, présente deux mutations (soulignées) dans le RBS (la séquence sauvage 5'-GGAGGAG-3' est mutée en 5'-TGAAGAG-3', complémentaire de 5'-CTCTTCA-3' dans l'oligo MUT) et
25 les deux sites de restriction *Bam*HI et *Xba*I (en gras).

La séquence de la région du plasmide pVE8020 à partir de laquelle est effectuée l'amplification (SEQ ID NO: 9) est représentée sur la Figure 2. Les chiffres à gauche de la séquence correspondent à la
30 numérotation de la séquence entière du plasmide pVE8020. Les zones d'appariement des amorces oligo 9 et oligo MUT sont représentées en gras et avec des flèches. Les séquences codant pour *ZitR* et une partie de *ZitS* sont indiquées. Les RBS (sites de fixation des ribosomes)

35 potentiels de *zitR* et *zitS* sont encadrés, et les codons d'initiation de la traduction ATG sont soulignés. Les

boites -35 et -10 du promoteur sont encadrées et surlignées en gris ; le site potentiel d'initiation de la transcription est indiqué par un soulignement double.

Le produit d'amplification de 700 pb est
 5 traité par le fragment Klenow (PolIK) de l'ADN polymérase d'*Escherichia coli*, puis par *XbaI*. Ce fragment modifié est purifié et cloné dans le vecteur pFUN, préalablement digéré par *EcoRV* et *XbaI* : le mélange de ligation (fragment + pFUN + ligase du phage T4) est utilisé pour
 10 électroporer la souche MG1363 de *Lactococcus lactis*, et des clones résistant à l'érythromycine sont sélectionnés sur milieu solide M17 + glucose 0,5% + érythromycine 5 µg/mL. Un de ces clones, contenant un plasmide recombinant de 8,2 kb, dénommé ci-après pDI11, est
 15 choisi.

Les étapes de la construction de ce plasmide sont représentées sur la Figure 3a.

Il contient la totalité de la séquence codant pour ZitR, ainsi qu'une séquence 5' comprenant le
 20 promoteur p_{zn} . Cette séquence 5' (SEQ ID NO:10) est représentée ci-après (jusqu'au site potentiel d'initiation de la transcription):
 GATCTGTCAGCTGGTTCAACTAGCGGTGGTCAAACCTGTAGTAATAAACTTATTGT
 TTTGATGTTTCGGCTTAAGGATGGAAGGATTTTTCAAATAAAAAAGTAAAAAATAATG
 25 TTAACCTGGTTGACATTATTTTTACTTTGCTATATAATTAACCGTA

Plasmide pDI12

pDI11 est digéré par *EcoRI* et *EcoRV* et traité par PolIK pour obtenir un fragment linéaire de 8,18 kb dépourvu des sites de restriction du MCS de pFUN (ce qui
 30 permet de les introduire ultérieurement ailleurs dans la construction), puis traité par la ligase du phage T4. La souche MG1363 est électroporée par le mélange de ligation, et un clone résistant à l'érythromycine et contenant le plasmide pDI12 est sélectionné comme décrit
 35 ci-dessus.

Plasmide pDI15

Le plasmide recombinant pDI15 est un dérivé de pDI12 dans lequel le site de restriction *NsiI* (localisé entre les gènes *ermAM* et *repD*, en position 2014 de pDI12) est éliminé, ce qui permet de l'introduire ultérieurement ailleurs dans la construction. pDI15 est digéré par *NsiI* et traité par la ligase du phage T4. Après ligation, et transformation de MG1363, des clones résistant à l'érythromycine sont sélectionnés comme précédemment. Un clone contenant un plasmide recombinant de 8,18 kb insensible à la digestion par *NsiI* est choisi : ce plasmide est dénommé ci-après pDI15.

Les étapes de la construction de pDI15 sont représentées sur la Figure 3b.

15 Construction de plasmides contenant un gène rapporteur sous contrôle du système de régulation de l'opéron *zitRSQP*

Plasmide pDI24

pDI24 comprend les éléments suivants : une séquence codant pour une protéine rapporteur permettant de tester le système, suivie par un terminateur.

La protéine rapporteur choisie est NucB, la forme dépourvue de peptide signal de la nucléase Nuc de *Staphylococcus aureus* (SHORTLE, Gene, 22, 181-189, 1983). Son cadre ouvert de lecture est cloné dans le plasmide pSEC1 (ou pVE3684, CHATEL et al, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8, 545-551, 2001) sous le contrôle du promoteur p_{nis} (inductible par la nisine) pour la transcription, et des signaux d'Usp45 de *L. lactis* pour la traduction (RBSUsp45 et codon d'initiation) et la sécrétion (peptide signal PSUsp45) : l'ensemble p_{nis} -RBSUsp45-PSUsp45 est cloné dans pDI24.

Le terminateur choisi est le terminateur T1T2 (PESCHKE et al, J. Mol. Biol., 186, 547-555, 1985) qui provient du plasmide pVE5239 (DIEYE et al, J. Bacteriol., 183, 4157-4166, 2001).

Pour la construction de pDI24, pSEC1 est digéré par *XhoI*, traité par l'ADN polymérase du phage T4, et digéré par *ClaI*, pour obtenir une forme linéaire de 3,8 kb. En parallèle, pVE5239 est digéré par *SacI*, traité par l'ADN polymérase du phage T4, et digéré par *ClaI*, pour obtenir un fragment de 217 pb contenant le terminateur T1T2. Ce fragment est purifié et ligaturé avec la forme linéaire du vecteur pSEC1, et le mélange de ligation est utilisé pour transformer la souche TG1 d'*E. coli*. Des clones résistant au chloramphénicol sont sélectionnés sur boîtes LBT + chloramphénicol 12,5 µg/mL. Un de ces clones, contenant un plasmide de 4 kb dénommé pDI24, est choisi.

Les étapes de la construction de pDI24 sont représentées sur la Figure 4.

Plasmides pDI1224 et pDI151

La fusion PSUsp45-NucB est placée sous le contrôle du système d'expression $p_{zn-zitR}$ dans les plasmides pDI12 et pDI15, pour produire les plasmides pDI1224 et pDI151.

pDI1224

pDI12 est digéré par *XbaI*, traité par l'ADN polymérase du phage T4, puis digéré par *BamHI*, pour obtenir une forme linéaire de 8,1 kb. En parallèle, pDI24 est digéré par *SacII*, traité par l'ADN polymérase du phage T4, et digéré par *BamHI*, pour obtenir un fragment de 932 pb contenant le cadre ouvert de lecture de la protéine rapporteur NucB (sous le contrôle de RBSUsp45 et de PSUsp45), et le terminateur de transcription T1T2. Ce fragment de 932 pb est purifié et ligaturé avec la forme linéaire du vecteur pDI12, et le produit de ligation utilisé pour transformer MG1363. Les transformants sont sélectionnés sur du milieu solide M17 + glucose 0,5%, + érythromycine 5µg/mL + EDTA 0,2 mM. L'EDTA permet d'induire, grâce au système $p_{zn-zitR}$, l'expression du rapporteur, et donc d'effectuer un premier crible du

phénotype Nuc⁺ des clones recombinants. Le test d'activité Nuc est effectué selon le protocole décrit par LE LOIR et al, (J. Bacteriol. 176, 5135-5139, 1994).

pDI151

5 pDI15 et pDI1224 sont digérés par *Bam*HI et *Sna*BI : cela donne lieu, pour le premier, à un vecteur linéaire tronqué dans le gène *ermAM* (qui confère la résistance à l'érythromycine), et, pour le second, à un fragment complémentaire de 2,043 kb qui contient : le
10 système d'expression *p_{zn}-zitR*, la protéine rapporteur NucB (sous le contrôle de *RBSUsp45* et *PSUsp45*), le terminateur T1T2 et la partie 5' du gène *ermAM* éliminée de pDI15.

Le mélange de ligation est utilisé pour
15 transformer MG1363, et les plasmides recombinants sélectionnés de la même manière que pour obtenir pDI1224, ce qui permet de confirmer que le clonage reconstitue le gène *ermAM* intact et rétablit la capacité des clones recombinants à résister à l'érythromycine.

20 pDI1224 et pDI151, dont les tailles sont respectivement de 9 et 12 kb, sont identiques à l'exception de la présence ou de l'absence du site *Nsi*I (présent en position 2014 dans pDI1224). Tous deux portent le système d'expression *p_{zn}-zitR*.

25 Les étapes de construction de pDI1224 et pDI151 sont représentées sur la Figure 5.

L'insert de ces plasmides contenant le gène rapporteur codant pour NucB, sous contrôle du système d'expression *p_{zn}-zitR*, est schématisé sur la Figure 6.

30 **EXEMPLE 3 : CONSTRUCTION DE PLASMIDES CONTENANT UNE SEQUENCE CODANT POUR UN PEPTIDE SIGNAL DE SECRETION**

Ces plasmides sont construits par substitution du signal de sécrétion *PSUsp45* des plasmides *pSEC* et pDI151 par le système de sécrétion d'Exp4.

35 La séquence codant pour le peptide signal d'Exp4 (*PSExp4*), accompagnée des signaux de traduction

d'Exp4, c'est-à-dire son RBS [ou RBSExp4] et son codon d'initiation de la traduction) est clonée à partir du plasmide pVE8022 (POQUET et al, 1998), en utilisant les oligonucléotides Exp4-5 et Exp4-3, dont les séquences

5 sont :

Exp4-5 : 5'-GTTCTAAGGATCCATTAAGGAG-3'

(SEQ ID NO: 11)

Exp4-3 : 5'-AAGTAGATGCATCAGCAAATACAACGGC-3'

(SEQ ID NO: 12)

10 Ces amorces sont basées sur la partie 5' du gène *exp4* de MG1363 (GenBank U95836)).

Exp4-5 et Exp4-3 introduisent des sites de restriction (en gras) aux extrémités de PSExp4 pour faciliter son clonage, respectivement *Bam*HI en 5' (en
15 amont de RBSExp4 [codé par AGGAAG dans Exp4-5]) et *Nsi*I en 3' (en aval du site de clivage potentiel de PSExp4). Le site *Nsi*I est introduit à une position qui permet le clonage de PSExp4 en phase avec NucB et qui perturbe peu la séquence : deux acides aminés se trouvent insérés à
20 l'extrémité N-terminale de NucB, Asp qui est le premier acide aminé de la forme mature d'Exp4 (codé par GAT dans Exp4-3) et Ala qui provient de l'insertion de *Nsi*I (codé par GCA dans Exp4-3). L'introduction d'une charge négative (Asp) et d'un petit acide aminé (Ala) en aval du
25 peptide signal d'une protéine sécrétée est une situation favorable pour une bonne efficacité de sécrétion (du fait de l'orientation correcte du peptide signal dans la membrane : c'est l'extrémité C-terminale chargée négativement qui est transloquée à travers la membrane,
30 alors que l'extrémité N-terminale chargée positivement reste du côté cytoplasmique).

L'amplification par Exp4-5 et Exp4-3 à partir de l'ADN du plasmide pVE8022 produit un fragment de 117 pb.

35 Le peptide codé par ce fragment répond à la séquence MKKINLALLTLATLMGVSSSTAVVFA↓DA (SEQ ID NO:13) qui

correspond à la séquence du peptide signal d'Exp4, jusqu'au site prédit de clivage (indiqué par une flèche) suivi de deux acides aminés insérés en amont de NucB.

Pour le clonage d'une protéine d'intérêt à la place de NucB, un troisième acide aminé sera introduit dans certains cas pour que PSExp4 et la protéine d'intérêt soient en phase. Ceci peut s'effectuer par exemple en introduisant la séquence NNATGCATCA (SEQ ID NO: 14) à l'extrémité 5' de l'amorce 5' qui servira à l'amplification PCR du cadre de lecture de ladite protéine d'intérêt. Cette séquence introduit un site *NsiI* (en gras) et un codon (TCA) correspondant à un petit acide aminé (Ser), qui ne perturbe que peu la structure de la protéine.

Le fragment de 117 pb résultant de l'amplification PCR du plasmide pVE8022 avec les oligonucléotides Exp4-5 et Exp4-3, est digéré avec *BamHI* et *NsiI*.

Ce fragment (PSExp4) est cloné dans le vecteur pDI151, ou dans le vecteur pSEC1, délétés de PSUsp45 par digestion par *BamHI* et *NsiI*. Le mélange de ligation est utilisé pour transformer MG1363 ou TG1, et les clones résistants à l'antibiotique correspondant (respectivement érythromycine ou chloramphénicol) sont sélectionnés.

Les plasmides résultants, pDI151-PSExp4, et pSEC-PSExp4, sont respectivement représentés sur les Figures 7 A et 7B.

REVENDECATIONS

1) Cassette d'expression constituée par :

- un promoteur bactérien, dénommé ci-après p_{zn} , contenant un site de fixation pour la protéine ZitR de *Lactococcus lactis*, lequel site comprend la séquence suivante :

AAAAATAANGTNNNNNNNTTGACATTATTTTT

(SEQ ID NO:1),

dans laquelle TTGACA représente la boîte -35 dudit promoteur, et N représente A, C, G, ou T ;

- une séquence codant pour un polypeptide présentant au moins 80% d'identité avec la protéine ZitR de *Lactococcus lactis*, placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur ;

- au moins un site de restriction permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

2) Cassette d'expression selon la revendication 1, caractérisée en ce que le promoteur p_{zn} comprend la séquence suivante :

AAAAATAANGTNNNNNNNTTGACATTATTTTTNNNNNNNNNTATAAT

(SEQ ID NO:2),

dans laquelle TATAAT représente la boîte -10 dudit promoteur.

3) Cassette d'expression selon la revendication 2, caractérisée en ce que le promoteur p_{zn} comprend une séquence choisie parmi :

- la séquence :

AAAAATAATGTAACTGGTTGACATTATTTTTACTTTGCTATATAATTAACCGTA

(SEQ ID NO:4) ;

- la séquence :

AAAAAATAACGTAACTGGTTGACATTATTTTTCTTTGCTATATAATTAACCGTA

(SEQ ID NO:5)

4) Cassette d'expression constituée par :

- un promoteur bactérien p_{zn} , tel que défini dans les revendications 1 à 3 ;

- au moins un site de restriction permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

5) Cassette d'expression résultant de l'insertion d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide d'adressage extracellulaire, et d'au moins un site de restriction permettant le clonage d'une séquence nucléotidique d'intérêt en fusion traductionnelle avec ledit peptide d'adressage, sous contrôle transcriptionnel du promoteur p_{zn} , dans une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 4.

6) Cassette d'expression selon la revendication 5, caractérisée en ce que ledit peptide d'adressage extracellulaire est un peptide signal de séquence : MKKINLALLTLATLMGVSSSTAVVFA (SEQ ID NO: 6).

7) Cassette d'expression résultant de l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel du promoteur p_{zn} , dans une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 6, à l'exclusion des cassettes d'expression comprenant tout ou partie de la séquence codant pour la protéine ZitS de *L. lactis*, fusionnée à un gène rapporteur.

8) Vecteur recombinant comprenant un insert constitué par une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 7.

9) Bactérie à gram-positif transformée par au moins une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 7.

10) Bactérie selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie lactique.

11) Utilisation d'une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 7, ou d'un vecteur recombinant selon la revendication 8, pour la production d'une protéine d'intérêt dans une bactérie à gram-positif.

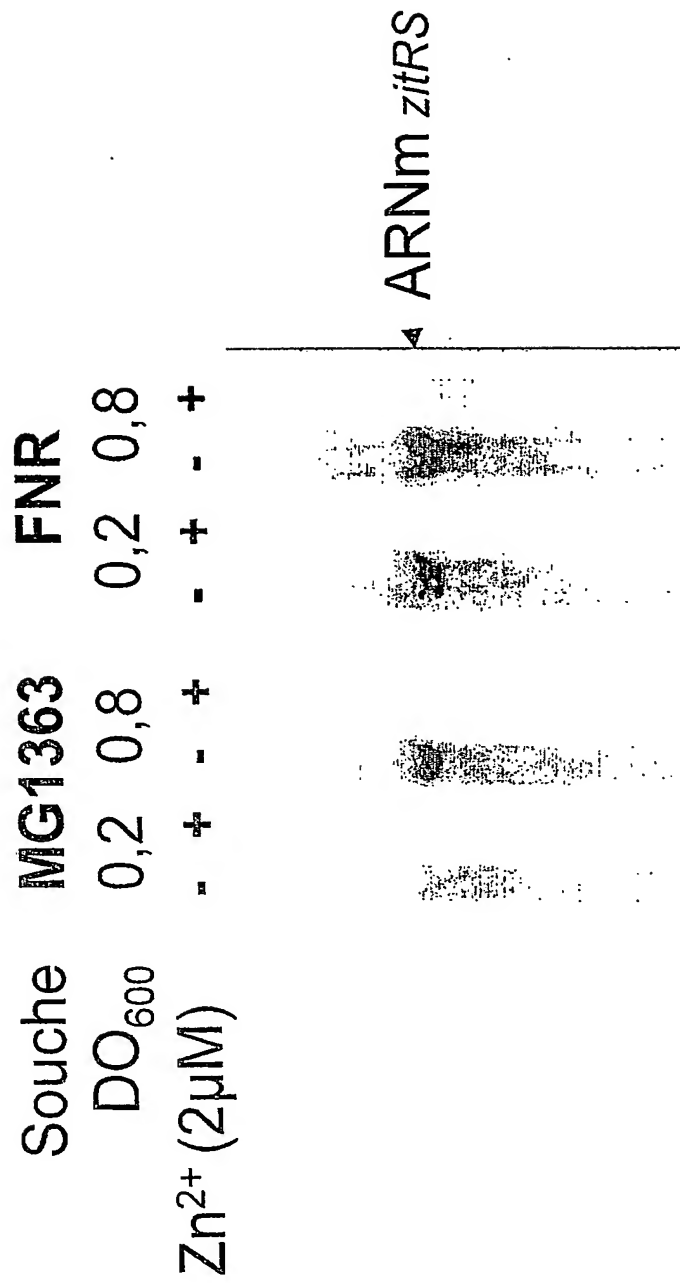


FIG. 1

```

7371 cacaggaac agctatgacc atgattacgc caagctcgaa attaacctc actaaaggga acaaaagctg ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggt atcgatagcc
7481 cgctaataga gcgggctttt ttttgatata gaattaccg ggaattcaga tctttgatca aggatctgtc agctgggttca actagcgggtg gtcaaaactgt tagtaataaa
      OLIGO 9
7591 acttattggt ttgatgttcg gcttaaggat ggaaggattt ttcaaatata aaagtaaaaa ataattgttaa ctggctgaca ttatttttac ttgtctatcatatataaccag
7701 taaactaatt atggaggaca aaatactatg antttagcaa atcaaatcga ccagtttctt ggggcaatta tgcagtttgc anaaacaag catgaaatat tactcgcgga
      >>..... zitR .....>
7811 atgcnaaagt aatgttaagc taacaagcac gcaagaacat atcttaatga ttctagctgc agaggtttcg acaaacgcga gaattgccga gcaactcaag atttcgccag
      >..... zitR .....>
7921 cagcggtaac taaagctctc aaaaaattac aagagcaaga actgattaaa tcaagtcggg caacaaatga cgaacgcgtg gtocittgga gcctgacaga aaaagcaatt
      >..... zitR .....>
8031 ccagttgcta aagaacatgc tgctcatcat gagaaactc taagtacctg ccaagaatta ggagacaaat ttactgacga agaacaacaaa gtgataagtc aattcttacc
      >..... zitR .....>
8141 agtacttaag gaggagtttc gatgaagaaa atattgatgt tatttgctat tccggcagtt ttacttcttg ctgggttgta aaaaacagca gacaaccag aagtttgac
      >..... zitR .....>
      >>..... zitS .....>
      OLIGO MUT
8251 aacttttgag ccgatgtatg aatttacgaa agcgattggt ggagataagg ttaaaattga aaatattgtt ccggcgaatc aagaagtca cgaatttgaa ccgagtgcca
      >..... zitS .....>
8361 ttacqaaaaa aatcgtagaa aatgcaaga aaattgaagt cgagtttgac aaagttcaaa gaactgataa atatggactg ggcttagcgt atatttatgc tgatggaaaa
      >..... zitS .....>

```

FIG. 2

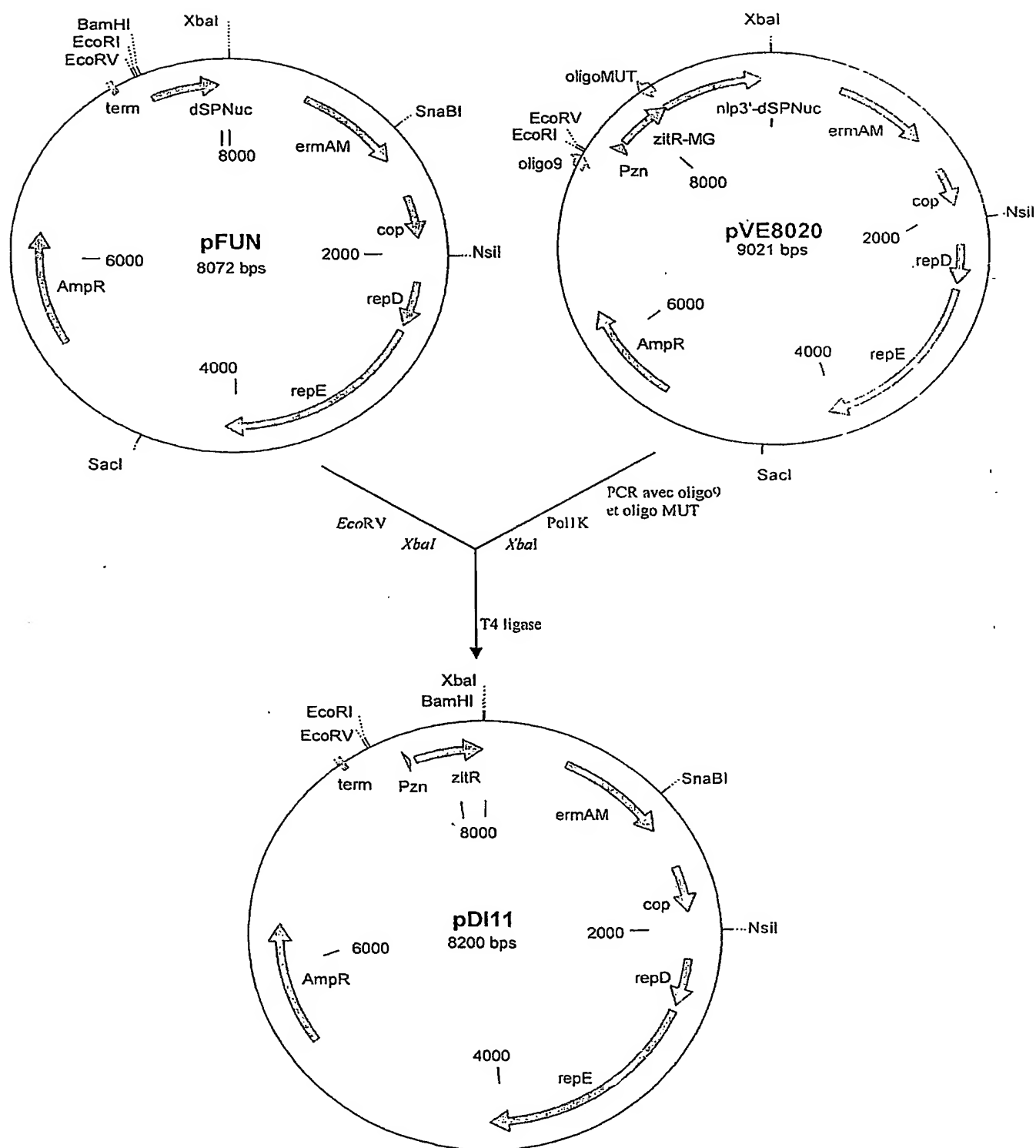


FIG. 3a

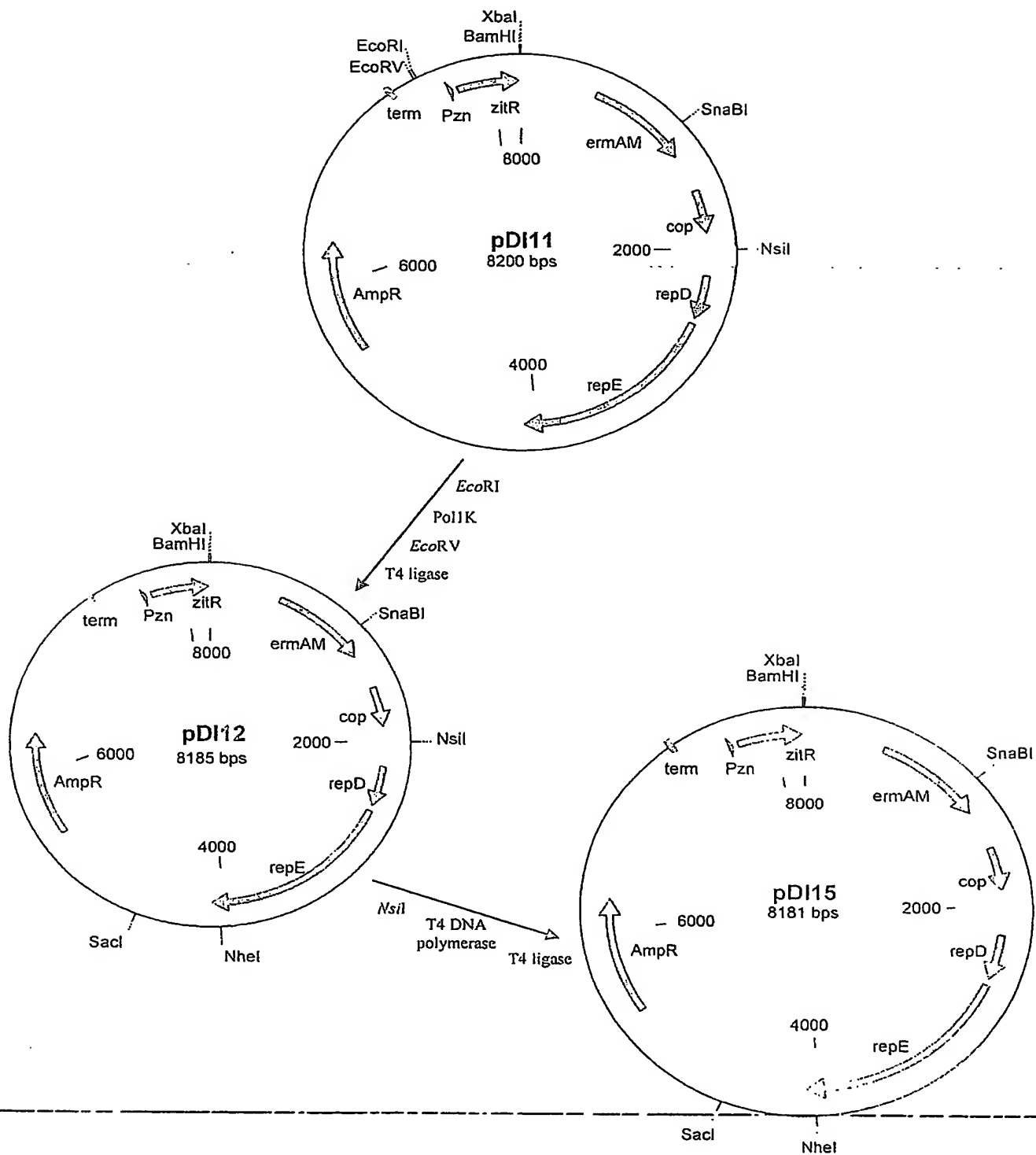


FIG. 3b

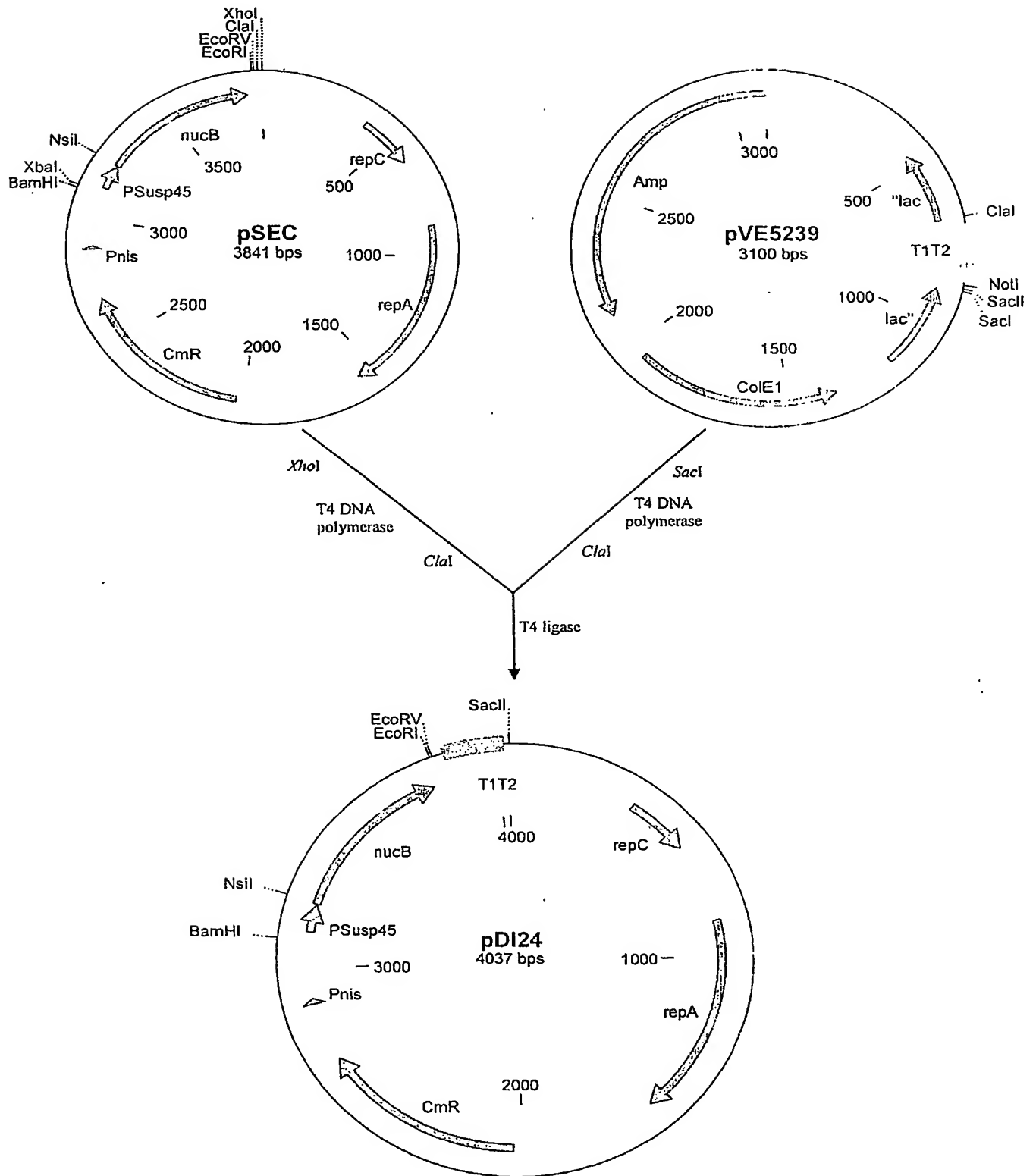


FIG. 4

6/8

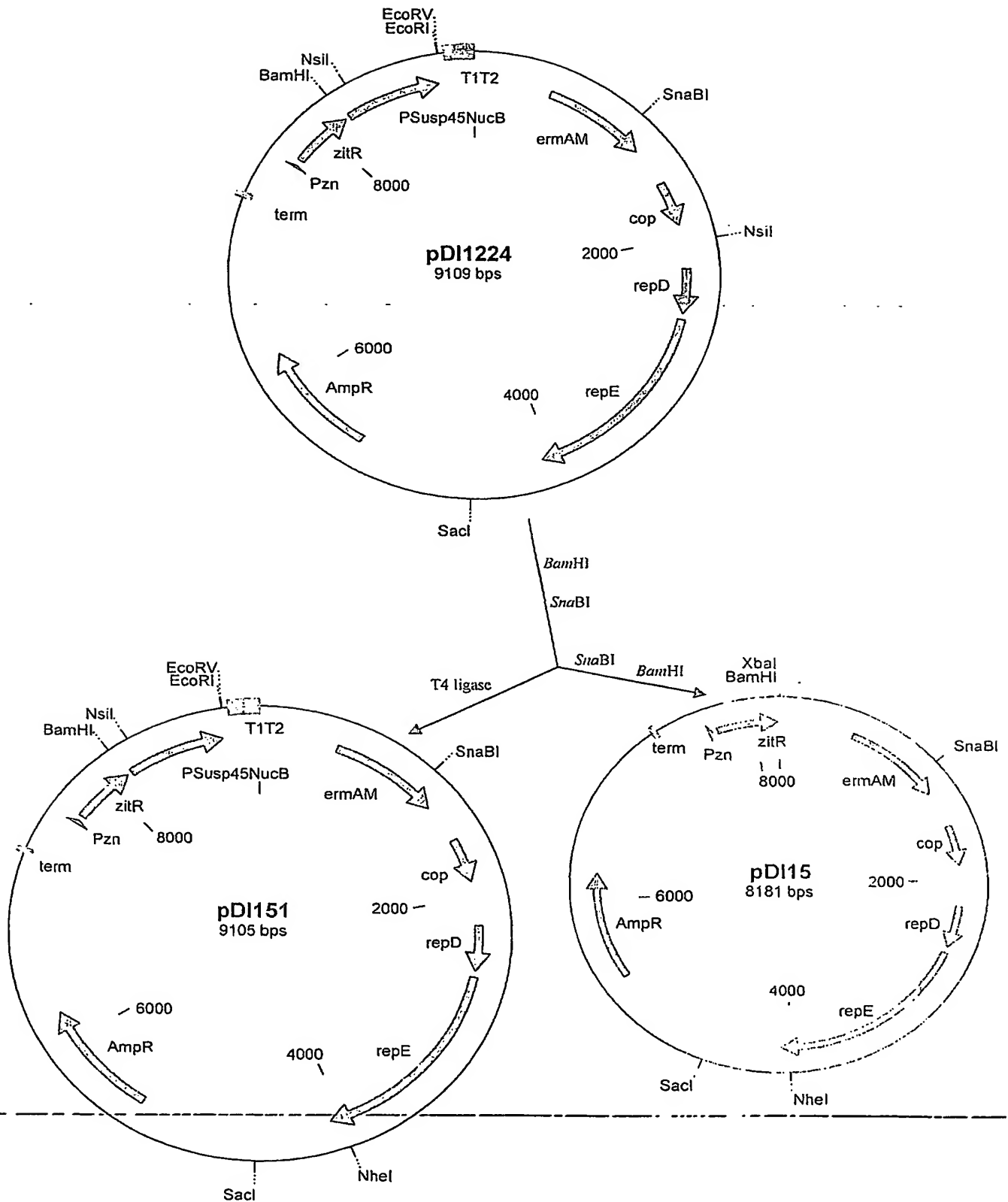


FIG. 5

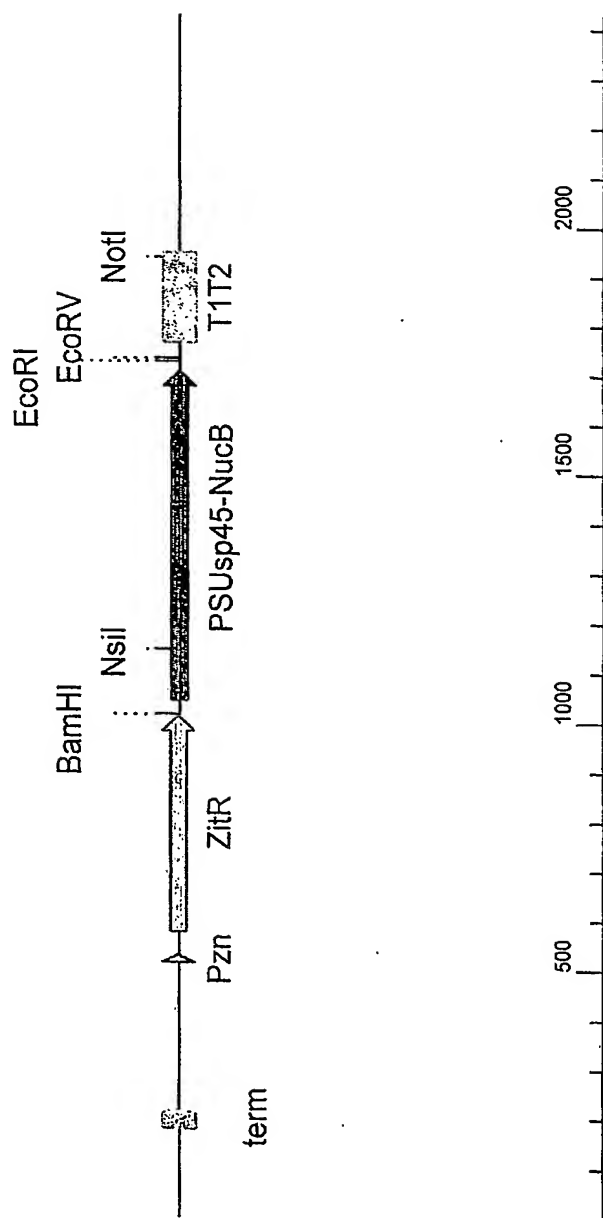
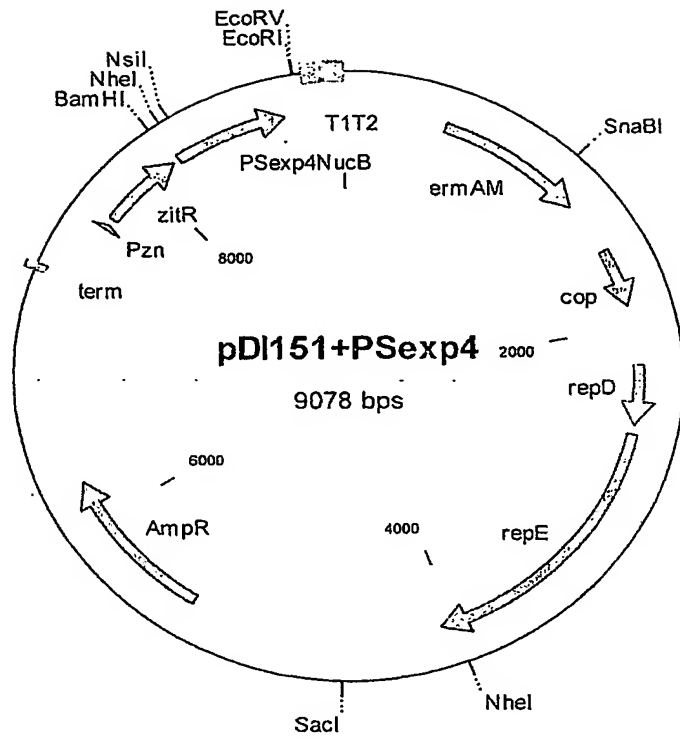


FIG. 6

A



B

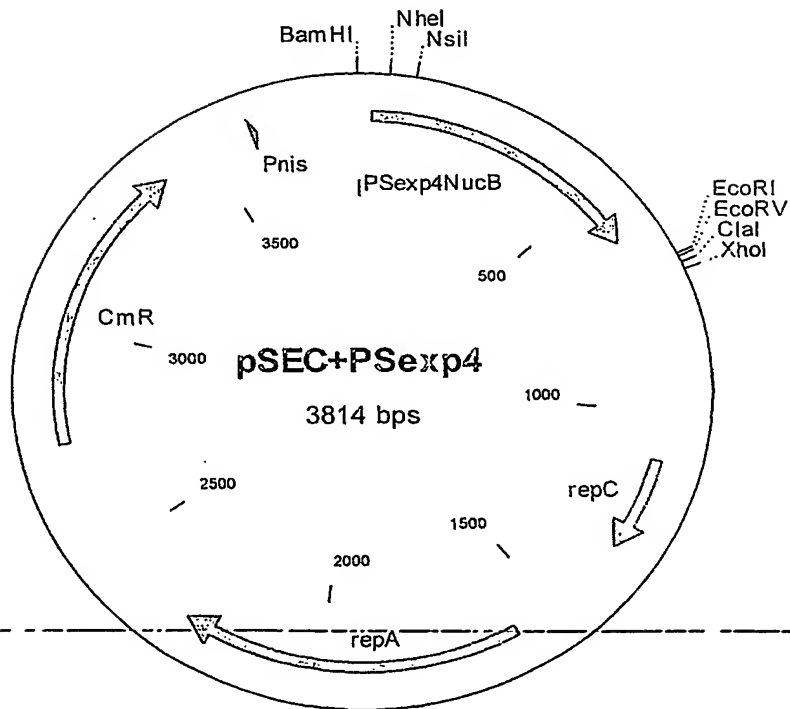


FIG. 7

539s116.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> INRA

<120> CASSETTES D'EXPRESSION PROCARYOTES REGULEES PAR LE ZINC

<130> MJPbv539/116

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence consensus du promoteur bactérien pzn

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> N représente A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> N représente A, C, G ou T

<220>

<221> -35_signal

<222> (19)..(24)

<223>

539s116.ST25.txt

<400> 1
aaaaataang tnnnnnnntt gacattattt tt

32

<210> 2

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence consensus du promoteur bactérien pzn

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> N représente A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(18)

<223> N représente A, C, G ou T

<220>

<221> -35_signal

<222> (19)..(24)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(41)

<223> N représente A, C, G ou T

<220>

<221> -10_signal

<222> (42)..(47)

<223>

<400> 2
aaaaataang tnnnnnnntt gacattattt tnnnnnnnn ntataat

47

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Y représente T ou C

<220>

<221> -35_signal

<222> (19)..(24)

<223>

<400> 3
aaaaataayg ttaactgggtt gacattattt tt

32

<210> 4

<211> 56

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> -35_signal

<222> (19)..(24)

<223>

<220>

<221> -10_signal

<222> (42)..(47)

<223>

539s116.ST25.txt

<400> 4
aaaaataatg ttaactgggt gacattattt ttacttttgct atataattaa ccagta 56

<210> 5

<211> 57

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> -35_signal

<222> (20)..(25)

<223>

<220>

<221> -10_signal

<222> (43)..(48)

<223>

<400> 5
aaaaaataac gttaactgggt tgacattatt ttttctttgc tatataatta accagta 57

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 6

Met Lys Lys Ile Asn Leu Ala Leu Leu Thr Leu Ala Thr Leu Met Gly
1 5 10 15

Val Ser Ser Thr Ala Val Val Phe Ala
20 25

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 7

ctaatagagcg ggcttttt

18

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 8

gctctagagc gggatccttc atcgaaactc ttcag

35

<210> 9

<211> 1100

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> -35_signal

<222> (295)..(300)

<223>

<220>

<221> -10_signal

<222> (318)..(323)

<223>

<220>

<221> RBS

<222> (343)..(348)

<223>

539s116.ST25.txt

<220>

<221> misc_feature

<222> (362)..(362)

<223> N représente A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (412)..(412)

<223> N représente A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (445)..(445)

<223> N représente A, C, G ou T

<220>

<221> RBS

<222> (780)..(786)

<223>

```

<400> 9
cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctcgaa attaaccctc actaaaggga      60
acaaaagctg ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggt atcgatagcc cgcctaataga      120
gcgggctttt ttttgatata gaattacccg ggaattcaga tctttgatca aggatctgtc      180
agctgggttca actagcgggtg gtcaaactgt tagtaataaaa acttattggtt ttgatgttcg      240
gcttaaggat ggaaggattt ttcaaataaa aaagtaaaaa ataatgttaa ctggttgaca      300
ttatTTTTTtac ttgtctatat aattaaccag taaactaatt atggaggaca aaatactatg      360
antttagcaa atcaaatacga ccagtttctt ggggcaatta tgcagtttgc anaaaacaag      420
catgaaatat tactcggcga atgcnaaagt aatgttaagc taacaagcac gcaagaacat      480
atcttaataga ttctagctgc agaggtttcg acaaacgcga gaattgccga gcaactcaag      540
atttcgccag cagcggtaac taaagctctc aaaaaattac aagagcaaga actgattaaa      600
tcaagtcggg caacaaatga cgaacgcgta gtcctttgga gcctgacaga aaaagcaatt      660
-----ccagtttgcta aagaacatgc tgctcatcat gagaaaactc taagtaccta ccaagaatta----- 720
ggagacaaat ttactgacga agaacaaaaa gtgataagtc aattcttatc agtacttacg      780
gaggagtttc gatgaagaaa atattgatgt tatttgctat tccggcagtt ttacttcttg      840

```

539s116.ST25.txt

```
ctggttgatca aaaaacagca gacaaaccag aagttgtgac aacttttgag ccgatgtatg 900
aattttacgaa agcgattggt ggagataagg ttaaaattga aaatattggt ccggcgaatc 960
aagaagttca cgaatttgaa ccgagtgccca ttacgaaaaa aatggtagaa aatgcaaaga 1020
aaattgaagt cgagtttgac aaagggtcaaa gaactgataa atatggacgt ggcttagcgt 1080
atatttatgc tgatggaaaa 1100
```

```
<210> 10
<211> 160
<212> DNA
<213> Lactococcus lactis
```

```
<220>
<221> -35_signal
<222> (123)..(128)
<223>
```

```
<220>
<221> -10_signal
<222> (146)..(151)
<223>
```

```
<400> 10
gatctgtcag ctggttcaac tagcgggtgg caaactgtta gtaataaaaac ttattgtttt 60
gatgttcggc ttaaggatgg aaggattttt caaataaaaa agtaaaaaaat aatgttaact 120
ggttgacatt atttttactt tgctatataa ttaaccagta 160
```

```
<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

```
<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR
```

```
<400> 11
gttctaagga tccattaact taaggag 27
```

539s116.ST25.txt

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce PCR

<400> 12

aagtagatgc atcagcaaatacaacggc

28

<210> 13

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide

<400> 13

Met Lys Lys Ile Asn Leu Ala Leu Leu Thr Leu Ala Thr Leu Met Gly
1 5 10 15

Val Ser Ser Thr Ala Val Val Phe Ala Asp Ala
20 25

<210> 14

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: lieu d'insertion

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> N représente A, C, G ou T

<400> 14
nnatgcatca

10

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270501

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv539/116FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 10805
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
CASSETTES D'EXPRESSION PROCARYOTES REGULEES PAR LE ZINC.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147, rue de l'Université 75007 PARIS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	POQUET
	Prénoms	Isabelle
	Rue	56-62 rue Vouillé
	Code postal et ville	75015 PARIS
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LLULL
	Prénoms	Daniel
	Rue	11, rue des Vignes
	Code postal et ville	91010 MASSY
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input type="checkbox"/>	Nom	
	Prénoms	
	Rue	
	Code postal et ville	
	Société d'appartenance (facultatif)	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S)		
DIXIÈME DEMANDEUR(S)		
DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 28 juillet 2003		
ORES Béatrice (n° 92-4046)		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.